

( Translation )

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: July 7, 2000

Application Number: Japanese Patent Application  
No. 206130/2000

Applicant(s): NIPPON SHOKUBAI CO., LTD.

April 20, 2001

Commissioner,  
Patent Office

Kozo Oikawa (seal)

Certificate No. 2001-3032779

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

JCS03 U.S. PTO.  
09/870821  
06/01/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 7月 7日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-206130

出 願 人

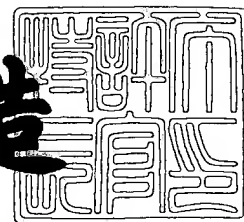
Applicant(s):

株式会社日本触媒

2001年 4月20日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3032779

【書類名】 特許願

【整理番号】 P00-0422

【提出日】 平成12年 7月 7日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 1/00

【発明の名称】 アルデヒド化合物を基質とする酵素反応方法

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社日本触媒内

【氏名】 仙波 尚

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株式会社日本触媒内

【氏名】 ▲土▼▲橋▼ 幸生

【特許出願人】

【識別番号】 000004628

【氏名又は名称】 株式会社 日本触媒

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】

【識別番号】 100101904

【弁理士】

【氏名又は名称】 島村 直己

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9406568

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アルデヒド化合物を基質とする酵素反応方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アルデヒド化合物を基質とする酵素反応において、アルカリ処理により基質のアルデヒド化合物中のカルボン酸化合物を除去した後、酵素反応を行うことを特徴とする酵素反応方法。

【請求項 2】 アルデヒド化合物を基質とする酵素反応において、アルカリ処理によりアルデヒド化合物中のカルボン酸化合物の含有量を 0.1 wt% 以下にしたアルデヒド化合物を基質として酵素反応を行うことを特徴とする酵素反応方法。

【請求項 3】 アルカリ処理が、アルデヒド化合物とアルカリ水溶液とを混合した後、水相と分離するものである請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】 酵素反応が、ヒドロキシニトリルリアーゼを触媒とし、アルデヒド化合物とシアン化水素とから光学活性シアノヒドリンを合成する反応である請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アルデヒド化合物を基質とする酵素反応方法、及び該酵素反応における反応阻害物質の除去方法に関する。

【0002】

【従来技術】

アルデヒド化合物を基質とする酵素反応は広く実施されている反応である。特に、アルデヒド化合物とシアン化水素とを基質として、光学活性シアノヒドリンを合成する酵素反応は、化学的には合成困難な光学活性シアノヒドリンを効率よく合成できる方法として有用である。

【0003】

このように上記反応は有用であるが、例えば、(R)-ヒドロキシニトリルリアーゼを触媒として用い、ベンズアルデヒドを基質として (R)-マンデロニトリル

を合成する場合、原料であるベンズアルデヒドに不純物である安息香酸が存在すると、反応が阻害されることが知られている。しかしながら、酵素反応を阻害する因子となる安息香酸などの不純物の許容濃度及び阻害因子の効果的な除去方法については知られていない。

原料であるアルデヒド化合物中に含まれる不純物を除去する方法としては蒸留分離があるが、蒸留設備が必要になること、また安息香酸などは昇華性があるため蒸留では完全に分離することが困難なこと、さらに加熱によってカルボン酸の生成を促進してしまうなど工業的に適応することは難しく、簡便かつ効果的に不純物を除去し目的生成物を高収率で得る酵素反応方法の開発が望まれていた。

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、アルデヒド化合物を基質とする酵素反応において、該酵素反応を阻害する物質を除去し、高収率で目的生成物を得る酵素反応方法を提供することを目的とする。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、アルデヒド化合物を基質に使用した酵素反応において、アルデヒド化合物に含まれ、該アルデヒド化合物に対応するカルボン酸化合物が酵素反応を阻害することを見出した。

そこでより簡便かつ確実にこれらの反応阻害物質を除去し、品質が低下したアルデヒド化合物をも酵素反応に支障なく用いるための方法として、アルデヒド化合物をアルカリ処理する方法を見出し本発明を完成させるに至った。

#### 【0006】

即ち、本発明は以下発明を包含する。

(1) アルデヒド化合物を基質とする酵素反応において、アルカリ処理により基質のアルデヒド化合物中のカルボン酸化合物を除去した後、酵素反応を行うことを特徴とする酵素反応方法。

(2) アルデヒド化合物を基質とする酵素反応において、アルカリ処理によりアルデヒド化合物中のカルボン酸化合物の含有量を 0.1 wt% 以下にしたアルデヒ

ド化合物を基質として酵素反応を行うことを特徴とする酵素反応方法。

(3) アルカリ処理が、アルデヒド化合物とアルカリ水溶液とを混合した後、水相と分離するものである前記(1)又は(2)に記載の方法。

(4) 酵素反応が、ヒドロキシニトリルリアーゼを触媒とし、アルデヒド化合物とシアン化水素とから光学活性シアノヒドリンを合成する反応である前記(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

#### 【0007】

##### 【発明の実施の形態】

本発明で用いられる酵素反応としては、アルデヒド化合物を基質とする酵素反応であれば特に限定されないが、アルデヒド化合物とともにシアン化水素を基質とする酵素反応が好ましい。

また、本発明に用いることのできる酵素としては、上記の酵素反応に用いられる酵素であれば特に制限はないが、アルデヒド化合物及びシアン化水素から光学活性シアノヒドリンを合成する反応に用いられるヒドロキシニトリルリアーゼが好ましく使用できる。

本明細書でいう「反応阻害物質」とは、上記酵素反応を阻害して反応速度を低下させたり、目的生成物の収率を低下させたりする物質のことをいい、アルデヒド化合物を基質とする上記酵素反応においては、当該アルデヒド化合物に対応するカルボン酸化合物等が挙げられる。

#### 【0008】

本発明で用いられるヒドロキシニトリルリアーゼとは、シアン化水素とカルボニル化合物とから光学活性なシアノヒドリンを合成する活性を有するものを意味し、R体のシアノヒドリンを合成するヒドロキシニトリルリアーゼ((R)-ヒドロキシニトリルリアーゼ)としては、アーモンド(*Prunus amygdalus*)などバラ科植物由来の(R)-ヒドロキシニトリルリアーゼ、アマ科植物由来の(R)-ヒドロキシニトリルリアーゼ、S体のシアノヒドリンを合成するヒドロキシニトリルリアーゼ((S)-ヒドロキシニトリルリアーゼ)としては、モロコシ(*Sorghum bicolor*)などイネ科植物由来の(S)-ヒドロキシニトリルリアーゼ、キャッサバ(*Manihot esculenta*)、パラゴムノキ(*Hevea brasiliensis*)などトウダイグサ科植物

由来の (S) -ヒドロキシニトリルリアーゼ、キシメニア (*Ximenia americana*) などボロボロノキ科植物由来の (S) -ヒドロキシニトリルリアーゼなどが例示できる。

## 【0009】

さらに、上記の酵素は酵素を含む生物組織からの抽出によって調製することができるが、上記酵素の遺伝子をクローニングし、当該遺伝子を組み込んで作成した遺伝子組換え生物によっても生産することができる。また、天然型のヒドロキシニトリルリアーゼ遺伝子を改変し、酵素機能を改変したヒドロキシニトリルリアーゼについても、上記の活性を有するものであれば本発明に含まれる。

本発明で用いられるアルデヒド化合物としては、特に制限されないが、水と混合したとき相分離し得るものが好ましい。

## 【0010】

具体的には次式 (I) :

## 【化1】



(式中、Rは、炭素数22以下の1価の炭化水素基を表し、前記炭化水素基中、 $-CH_2-$ 並びに $-CH_3$ の $CH_2$ はカルボニル基、スルホニル基、 $-O-$ 又は $-S-$ で置き換えられていてもよく、 $=CH_2$ は $=O$ 又は $=S$ で置き換えられていてもよく、また $-CH_2-$ の $C-H$ 、 $-CH_3$ の $C-H$ 、 $>CH-$ の $C-H$ 、 $=CH-$ の $C-H$ 並びに $=CH_2$ の $C-H$ は、N又はC-ハロゲンで置き換えられていてもよい。)

で示される。

## 【0011】

前記式 (I) において、炭素数22以下の1価の炭化水素基とは、直鎖状又は分岐状の鎖状炭化水素基、側鎖のない又は側鎖のある単環式炭化水素基、側鎖のない又は側鎖のある多環式炭化水素基、側鎖のない又は側鎖のあるスピロ炭化水素基、側鎖のない又は側鎖のある環集合構造の炭化水素基、あるいは、前記の環式炭化水素基が置換した鎖状炭化水素基のいずれをも含む。また、飽和な炭化水素基並びに不飽和な炭化水素基のいずれをも含むが、不飽和な炭化水素基におい



て、 $C=C=C$ のアレン構造を含む基は除く。直鎖状又は分岐状の鎖状炭化水素基としては、例えば、飽和な鎖状炭化水素基である、炭素数 2 以上の直鎖状アルキル基、炭素数 3 以上の分岐状アルキル基、不飽和な鎖状炭化水素基である、炭素数 2 以上の直鎖状アルケニル基、炭素数 3 以上の分岐状アルケニル基、炭素数 3 以上の直鎖状アルキニル基、炭素数 4 以上の分岐状アルキニル基、炭素数 4 以上の直鎖状アルカジエニル基、炭素数 5 以上の分岐状アルカジエニル基などを例示することができる。単環式炭化水素基としては、例えば、飽和な単環式炭化水素基である、炭素数 3 以上の側鎖のないシクロアルキル基、総炭素数 4 以上の側鎖のあるシクロアルキル基、不飽和な単環式炭化水素基である、炭素数 4 以上の側鎖のないシクロアルケニル基、総炭素数 5 以上の側鎖のあるシクロアルキニル基、炭素数 5 以上の側鎖のないシクロアルカジエニル基、総炭素数 6 以上の側鎖のあるシクロアルカジエニル基などを例示することができる。不飽和な単環式又は多環式炭化水素基としては、芳香族炭化水素基、例えば、フェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、9-アントリル基など総炭素数 6~22 の側鎖のない芳香族基、総炭素数 7 以上の側鎖のある芳香族基、更には、環集合構造の炭化水素基でもある、炭素数 12 のフェニルフェニル基、総炭素数 13 以上の側鎖のあるフェニルフェニル基を例示することができる。また、多環式炭化水素基としては、炭素数 6 以上の側鎖のない縮合環式炭化水素基、総炭素数 7 以上の側鎖のある縮合環式炭化水素基、炭素数 7 以上の側鎖のない架橋環式炭化水素基、総炭素数 8 以上の側鎖のある架橋環式炭化水素基、総炭素数 9 以上の側鎖のないスピロ炭化水素基、総炭素数 10 以上の側鎖のあるスピロ炭化水素基などを例示することができる。なお、前記の側鎖のない縮合環式炭化水素基において、縮合する環の一つがベンゼン環である場合、その総炭素数が 9 以上となるものを挙げることができ、前記の側鎖のある縮合環式炭化水素基において、縮合する環の一つがベンゼン環である場合、その総炭素数が 10 以上となるものを挙げるができる。環集合構造の炭化水素基としては、総炭素数 6 以上の側鎖のないシクロアルキルシクロアルキル基、総炭素数 7 以上の側鎖のあるシクロアルキルシクロアルキル基、総炭素数 6 以上の側鎖のないシクロアルキリデンシクロアルキル基、総炭素数 7 以上の側鎖のあるシクロアルキリデンシクロアルキル基などを例示する

ことができる。なお、これらの環式炭化水素において、側鎖のあるとは、環上に鎖状炭化水素基が置換していることを意味する。前述する環式炭化水素基が置換した鎖状炭化水素基としては、総炭素数 7 以上の側鎖のない芳香族基で置換された直鎖状アルキル基、総炭素数 8 以上の側鎖のある芳香族基で置換された直鎖状アルキル基、総炭素数 9 以上の側鎖のない芳香族基で置換された分岐状アルキル基、総炭素数 10 以上の側鎖のある芳香族基で置換された分岐状アルキル基、総炭素数 8 以上の側鎖のない芳香族基で置換された直鎖状アルケニル基、総炭素数 9 以上の側鎖のある芳香族基で置換された直鎖状アルケニル基、総炭素数 9 以上の側鎖のない芳香族基で置換された分岐状アルケニル基、総炭素数 10 以上の側鎖のある芳香族基で置換された分岐状アルケニル基、総炭素数 8 以上の側鎖のない芳香族基で置換された直鎖状アルキニル基、総炭素数 9 以上の側鎖のある芳香族基で置換された直鎖状アルキニル基、総炭素数 10 以上の側鎖のない芳香族基で置換された分岐状アルキニル基、総炭素数 11 以上の側鎖のある芳香族基で置換された分岐状アルキニル基、総炭素数 10 以上の側鎖のない芳香族基で置換された直鎖状アルカジエニル基、総炭素数 11 以上の側鎖のある芳香族基で置換された直鎖状アルカジエニル基、総炭素数 11 以上の側鎖のない芳香族基で置換された分岐状アルカジエニル基、総炭素数 12 以上の側鎖のある芳香族基で置換された分岐状アルカジエニル基、総炭素数 4 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された直鎖状アルキル基、総炭素数 5 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された直鎖状アルキル基、総炭素数 6 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された分岐状アルキル基、総炭素数 7 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された分岐状アルキル基、総炭素数 5 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された直鎖状アルケニル基、総炭素数 6 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された直鎖状アルケニル基、総炭素数 6 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された分岐状アルケニル基、総炭素数 7 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された分岐状アルケニル基、総炭素数 5 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された直鎖状アルキニル基、総炭素数 6 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された直鎖状アルキニル基、総炭素数 7 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された分岐状アルキニル基、総炭素数 8 以上の側鎖のあるシク

ロアルキル基で置換された分岐状アルキニル基、総炭素数 8 以上の側鎖のないシクロアルキル基で置換された分岐状アルカジエニル基、総炭素数 9 以上の側鎖のあるシクロアルキル基で置換された分岐状アルカジエニル基などを例示することができる。

## 【 0 0 1 2 】

なお、以下においては、側鎖のない芳香族基、側鎖のある芳香族基、並びに、フェニルフェニル基又は側鎖のあるフェニルフェニル基などを併せて、アリール基といい、このアリール基で置換された直鎖状又は分岐状のアルキル基をアラルキル基という。他の環式炭化水素基に関しても、特に明記しない場合、環上に側鎖のないものとあるものを併せて指す場合には、単にシクロアルキル基等の名称を用いる。鎖状炭化水素基についても、直鎖状のものと分岐状のものを併せて指す場合には、単にアルキル基等の名称を用いる。

## 【 0 0 1 3 】

前記炭化水素基中、 $-\text{CH}_2-$ がカルボニル基、スルホニル基、 $-\text{O}-$ 又は $-\text{S}-$ で置き換えられると、それぞれケトン、スルホン、エーテル又はチオエーテルの構造が導入され、 $-\text{CH}_3$ の $-\text{CH}_2-$ がカルボニル基、 $-\text{O}-$ 又は $-\text{S}-$ で置き換わると、それぞれホルミル基（アルデヒド）、水酸基又はメルカプト基に変わり、あるいは、末端の $=\text{CH}_2$ が $=\text{O}$ 又は $=\text{S}$ に置き換わると、ケトン、チオケトンの構造が導入されることを意味し、また、 $-\text{CH}_2-$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $-\text{NH}-$ となり、 $>\text{CH}-$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $>\text{N}-$ となり、 $=\text{CH}-$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $=\text{N}-$ となり、末端の $-\text{CH}_3$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $-\text{NH}_2$ が導入され、 $=\text{CH}_2$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{N}$ に変わると、 $=\text{NH}$ となる。また、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-$ 、 $=\text{CH}-$ 、 $\equiv\text{CH}$ 又は $>\text{CH}-$ の $\text{C}-\text{H}$ が $\text{C}-\text{ハロゲン}$ で置き換えられると、当該炭素上へハロゲン原子を置換することになる。なお、炭素鎖中における $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $\text{N}$ への置き換えは、当該炭化水素基に対する、それぞれオキサ置換、チア置換、アザ置換に当たり、例えば、炭化水素環の環の骨格炭素で起こると、炭化水素環のそれぞれ含酸素複素環、含硫黄複素環、含窒素複素環への変換となる。該炭化水素基中、 $\text{CH}_2$ 並びに $\text{C}-\text{H}$ における置き換えは、それぞれ独立に行われてよく、加えて、前記の置き換えを行った

後、なお当該炭素上に $\text{CH}_2$ 又は $\text{C}-\text{H}$ が残存する際には、更に置き換えがなされてもよい。

【0014】

本明細書において、ハロゲン原子とは、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子を指すが、フッ素原子、塩素原子、臭素原子が好ましい。

従って、前記炭化水素基としては、鎖状炭化水素基並びに環式炭化水素基など環構造を有する炭化水素基のいずれをも選択でき、例えば、飽和鎖状炭化水素基である直鎖状又は分岐状のアルキル基、不飽和鎖状炭化水素基である直鎖状又は分岐状のアルケニル基、直鎖状又は分岐状のアルキニル基、直鎖状又は分岐状のアルカジエニル基など、飽和な環式炭化水素基であるシクロアルキル基、不飽和な環式炭化水素基であるシクロアルケニル基、シクロアルキニル基、シクロアルカジエニル基など、芳香族炭化水素基であるアリール基、アラルキル基、アリールアルケニル基などが挙げられる。

【0015】

更に詳しくいえば、直鎖状又は分岐状のアルキル基としては、例えばエチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、1-メチルプロピル基、ペンチル基、1-メチルブチル基、ヘキシル基、1-メチルペンチル基、ヘプチル基、1-メチルヘキシル基、1-エチルペンチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、2-メチルプロピル基、2-メチルブチル基、3-メチルブチル基、2-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、4-メチルペンチル基、メチルヘキシル基、メチルヘプチル基、メチルオクチル基、メチルノニル基、1, 1-ジメチルエチル基、1, 1-ジメチルプロピル基、2, 6-ジメチルヘプチル基、3, 7-ジメチルオクチル基、2-エチルヘキシル基など、シクロアルキルアルキル基としては、シクロペンチルメチル基、シクロヘキシルメチル基など、シクロアルキル基としては、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、メチルシクロペンチル基、シクロヘキシル基、メチルシクロヘキシル基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基など、ビスシクロアルキル基としては、ノルボルニル基、ビスシクロ[2. 2. 2]オクチル基、アダマンチル基などが挙げられる。直鎖状又は分岐状のアル

ケニル基としては、例えばビニル基、アリル基、クロチル基（2-ブテニル基）、イソプロペニル基（1-メチルビニル基）など、シクロアルケニル基又はシクロアルカジエニル基としては、シクロペンテニル基、シクロペンタジエニル基、シクロヘキセニル基、シクロヘキサンジエニル基などが挙げられる。直鎖状又は分岐状のアルキニル基としては、例えばエチニル基、プロピニル基、ブチニル基などが挙げられる。アリール基としては、例えばフェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基、2-フェニルフェニル基、3-フェニルフェニル基、4-フェニルフェニル基、9-アントリル基、メチルフェニル基、ジメチルフェニル基、トリメチルフェニル基、エチルフェニル基、メチルエチルフェニル基、ジエチルフェニル基、プロピルフェニル基、ブチルフェニル基などが挙げられる。アラルキル基としては、例えばベンジル基、1-ナフチルメチル基、2-ナフチルメチル基、フェネチル基（2-フェニルエチル基）、1-フェニルエチル基、フェニルプロピル基、フェニルブチル基、フェニルペンチル基、フェニルヘキシル基、メチルベンジル基、メチルフェネチル基、ジメチルベンジル基、ジメチルフェネチル基、トリメチルベンジル基、エチルベンジル基、ジエチルベンジル基などが挙げられる。アリールアルケニル基としては、例えばスチリル基、メチルスチリル基、エチルスチリル基、ジメチルスチリル基、3-フェニル-2-プロペニル基などが挙げられる。

## 【0016】

前記炭化水素基中の $\text{CH}_2$ がカルボニル基、スルホニル基、O又はSで、又はC-HがN又はC-ハロゲンで置き換えられた基としては、ケトン、アルデヒド、スルホン、エーテル、チオエーテル、アミン、アルコール、チオール、ハロゲン、複素環（例えば、含酸素複素環、含硫黄複素環、含窒素複素環）などの構造を一つ以上含む基が挙げられる。なお、含酸素複素環、含硫黄複素環、含窒素複素環とは、環式炭化水素基の環骨格の炭素がそれぞれ酸素、硫黄、窒素で置き換わるものを意味し、更には、これらヘテロ原子置換が二種以上ある複素環であってもよい。前記の置換を有する炭化水素基としては、例えば、ケトン構造のアセチルメチル基、アセチルフェニル基；スルホン構造のメタンスルホニルメチル基；エーテル構造のメトキシメチル基、メトキシエチル基、エトキシエチル基、メ

トキシプロピル基、ブトキシエチル基、エトキシエトキシエチル基、メトキシフェニル基、ジメトキシフェニル基、フェノキシメチル基；チオエーテル構造のメチルチオメチル基、メチルチオフェニル基；アミン構造の2-アミノプロピル基、3-アミノプロピル基、2, 3-ジアミノプロピル基、2-アミノブチル基、3-アミノブチル基、4-アミノブチル基、2, 3-ジアミノブチル基、2, 4-ジアミノブチル基、3, 4-ジアミノブチル基、2, 3, 4-トリアミノブチル基、メチルアミノメチル基、ジメチルアミノメチル基、メチルアミノエチル基、プロピルアミノメチル基、シクロペンチルアミノメチル基、アミノフェニル基、ジアミノフェニル基、アミノメチルフェニル基；含酸素複素環のテトラヒドロフラニル基、テトラヒドロピラニル基、モルホリルエチル基；含酸素複素芳香環のフリル基、フルフリル基、ベンゾフリル基、ベンゾフルフリル基；含硫黄複素芳香環のチエニル基；含窒素複素芳香環のピロリル基、イミダゾリル基、オキサゾリル基、チアジアゾリル基、ピリジル基、ピリミジニル基、ピリダジニル基、ピラジニル基、テトラジニル基、キノリル基、イソキノリル基、ピリジルメチル基；アルコール構造の2-ヒドロキシプロピル基、3-ヒドロキシプロピル基、2, 3-ジヒドロキシプロピル基、2-ヒドロキシブチル基、3-ヒドロキシブチル基、4-ヒドロキシブチル基、2, 3-ジヒドロキシブチル基、2, 4-ジヒドロキシブチル基、3, 4-ジヒドロキシブチル基、2, 3, 4-トリヒドロキシブチル基、ヒドロキシフェニル基、ジヒドロキシフェニル基、ヒドロキシメチルフェニル基、ヒドロキシエチルフェニル基；チオール構造の2-メルカプトエチル基、2-メルカプトプロピル基、3-メルカプトプロピル基、2, 3-ジメルカプトプロピル基、2-メルカプトブチル基、3-メルカプトブチル基、4-メルカプトブチル基、メルカプトフェニル基；ハロゲン化炭化水素基である2-クロロエチル基、2-クロロプロピル基、3-クロロプロピル基、2-クロロブチル基、3-クロロブチル基、4-クロロブチル基、フルオロフェニル基、クロロフェニル基、ブロモフェニル基、ジフルオロフェニル基、ジクロロフェニル基、ジブロモフェニル基、クロロフルオロフェニル基、トリフルオロフェニル基、トリクロロフェニル基、フルオロメチルフェニル基、トリフルオロメチルフェニル基；アミン構造とアルコール構造を有する2-アミノ-3-ヒドロキシプロ

ピル基、3-アミノ-2-ヒドロキシプロピル基、2-アミノ-3-ヒドロキシブチル基、3-アミノ-2-ヒドロキシブチル基、2-アミノ-4-ヒドロキシブチル基、4-アミノ-2-ヒドロキシブチル基、3-アミノ-4-ヒドロキシブチル基、4-アミノ-3-ヒドロキシブチル基、2, 4-ジアミノ-3-ヒドロキシブチル基、3-アミノ-2, 4-ジヒドロキシブチル基、2, 3-ジアミノ-4-ヒドロキシブチル基、4-アミノ-2, 3-ジヒドロキシブチル基、3, 4-ジアミノ-2-ヒドロキシブチル基、2-アミノ-3, 4-ジヒドロキシブチル基、アミノヒドロキシフェニル基；ハロゲンと水酸基で置換された炭化水素基であるフルオロヒドロキシフェニル基、クロロヒドロキシフェニル基などが挙げられる。

## 【 0 0 1 7 】

前記式 (I) で示されるアルデヒド化合物としては、例えば、ベンズアルデヒド、m-フェノキシベンズアルデヒド、p-メチルベンズアルデヒド、o-クロロベンズアルデヒド、m-クロロベンズアルデヒド、p-クロロベンズアルデヒド、m-ニトロベンズアルデヒド、3, 4-メチレンジオキシベンズアルデヒド、2, 3-メチレンジオキシベンズアルデヒド、フェニルアセトアルデヒド、フルフラール等の芳香族アルデヒド；ブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド、バレルアルデヒド、シクロヘキサンアルデヒド等の脂肪族アルデヒド；2-(アルコキシカルボニルアミノ)-3-シクロヘキシルプロピオンアルデヒド等の2-(保護アミノ)アルデヒド；3-メチルチオプロピオンアルデヒド等のアルキルチオ脂肪族アルデヒドが挙げられる。

## 【 0 0 1 8 】

前記アルデヒド化合物を光学活性シアノヒドリンに変換するためには、シアン化水素を原料として用いるが、シアン化水素の供給方法としては常法により液体として供給する方法、又は常法により気体として供給する方法のいずれをも採用することができる。また、シアン化水素だけではなく、シアン化水素の水溶液であるシアン化水素酸(すなわちシアン化水素水溶液)も全く同様に用いることができる。さらに、反応系へ添加することによってシアン化物イオン(CN<sup>-</sup>)を生じる物質であれば用いることができ、例えば、シアン化ナトリウムやシアン化カリ

ウムなどのシアン化水素の塩、又は、アセトンシアノヒドリン等のシアノヒドリン類が挙げられる。

## 【 0 0 1 9 】

本発明において、原料として用いることのできるアルデヒド化合物の純度は特に限定されないが、カルボン酸化合物を含むアルデヒド化合物を酵素反応にそのまま用いた場合、酵素活性が阻害されるので、そのようなアルデヒド化合物を本発明において好適に使用できる。特に、原料アルデヒド化合物の濃度を1M以上の高濃度にして酵素反応を行う場合、カルボン酸化合物を0.1wt%以上含む前記濃度以上のアルデヒド化合物を使用すると、酵素反応が顕著に阻害されるので、本発明の方法により酵素反応を行うのが望ましい。

## 【 0 0 2 0 】

本発明におけるアルカリ処理とは、アルデヒド化合物をアルカリ性の水溶液と混合し、その後、常法により水相をアルデヒド相から分離する方法である。こうしてアルカリ処理を行ったアルデヒド化合物はそのまま酵素反応に用いてもよいし、さらに常法により精製して酵素反応に用いてもよい。

本発明において、アルカリ処理に用いることのできるアルカリには、水溶液としたときにアルカリ性を示す物質であれば特に限定されず、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、アンモニア等の無機塩基化合物、及びアミノ化合物等の有機塩基化合物が挙げられる。

## 【 0 0 2 1 】

アルカリ水溶液の濃度は特に限定されないが、好ましくは0.001N~10N、更に好ましくは0.01N~5N程度の濃度のアルカリ水溶液がよい。また、アルカリ処理を行ったアルデヒド化合物をそのまま酵素反応液に添加した場合、酵素の活性が損なわれるpHにならなければよい。

アルカリ水溶液の添加量はアルデヒド化合物と混合した際、アルデヒド相と相分離しうる以上の量、又は、アルデヒド化合物に含まれているカルボン酸化合物等の反応阻害物質の含有量に応じて適宜決めることができる。また、アルカリ処理は、1回でもよいし、又はカルボン酸化合物等の反応阻害物質が所望の濃度以下になるまで繰り返し行ってもよい。



## 【 0 0 2 2 】

上記のアルカリ処理をしたアルデヒド化合物は、反応阻害物質をほとんど含まず、特に、反応阻害物質のうち該アルデヒド化合物に対応するカルボン酸化合物はほとんど除去され、その含量については0.1 wt%以下、好ましくは0.05 wt%以下にすることができる。これらのアルカリ処理したアルデヒド化合物を、アルデヒド化合物を基質とする酵素反応に用いることができる。

原料となるアルデヒド化合物に上記のようなアルカリ処理をすることにより、アルデヒド化合物中の反応阻害物質、特に該アルデヒド化合物に対応するカルボン酸化合物を効果的に除去でき、このようなアルカリ処理したアルデヒド化合物を酵素反応に用いると、上記カルボン酸化合物等の反応阻害物質によって酵素反応が阻害されることがなくなるため、目的生成物の収率を大幅に改善することができる。

## 【 0 0 2 3 】

## 【実施例】

以下に本発明を、実施例を示して具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

## (調製例1) (R)-ヒドロキシニトリルリアーゼの調製

(1) アーモンド種子粉碎物100gにアセトン200mlを混合し、2時間攪拌した後、濾過し、固形分を回収した。この固形分を乾燥したものに水600gを加え、アンモニア水でpH7.5に調整した後、攪拌混合を一晩行った。次いで、このスラリーを遠心分離し、上澄液を回収した。この上澄液のpHを5.5に調整した後、遠心分離し、不溶分を除去した液を回収した。

(2) 前記(1)で調製した(R)-ヒドロキシニトリルリアーゼ酵素液の活性を測定した。酵素活性はDL-マンデロニトリルを基質として基質が酵素によって分解されベンズアルデヒドが生成される速度を249.6nmの吸光度変化を測定することによって測定し、活性を算出した。ここで、1単位(U; unit)は1分間にベンズアルデヒド1μmolを生成する活性と定義した。この方法で前記(1)で調製した酵素液の酵素活性を測定したところ、60.57U/mlの活性で酵素を2.5万単位回収することができたことがわかった。

## 【 0 0 2 4 】

(調製例 2) 固定化 (R) -ヒドロキシニトリルリアーゼの調製

調製例 1 の方法で調製した (R) -ヒドロキシニトリルリアーゼ酵素液を硫酸沈澱処理し、酵素を濃縮し、1000 U/ml の酵素液を調製した。この酵素液 1 ml に対して 1 g の固定化担体 (多孔性シリカゲル、microbead silicagel 300A、富士シリシア化学製) を混合した。これをそのまま合成反応に用いることにした。

## 【 0 0 2 5 】

(実施例 1) アルデヒド化合物に含まれる反応阻害物質の酵素反応に対する影響

2-クロロ安息香酸 (反応阻害物質) の含量が検出限界以下である 2-クロロベンズアルデヒドを、0.15M クエン酸緩衝液 (pH 5.5) で飽和させた t-ブチルメチルエーテルに溶解し、1M の 2-クロロベンズアルデヒド溶液を調製した。これに 2-クロロ安息香酸を種々の含量で添加し、2-クロロ安息香酸含量の異なるアルデヒド溶液を調製した。

この溶液 5ml に対し、固定化した (R) -ヒドロキシニトリルリアーゼ (600 単位) を投入後、青酸を 1.5M になるよう添加して、(R) -2-クロロマンデロニトリルの合成反応を行った。反応開始 5 時間後に反応液の一部をサンプリングし、HPLC によりアルデヒドの転換率を測定した。2-クロロ安息香酸を添加しなかった場合に対する 2-クロロ安息香酸を添加した場合の相対反応速度を、2-クロロベンズアルデヒド中の 2-クロロ安息香酸濃度に対してプロットしたものを図 1 に示す。

## 【 0 0 2 6 】

この結果、カルボン酸である 2-クロロ安息香酸の濃度が高いほど酵素反応速度が低下し、カルボン酸化合物が反応阻害物質として作用していることがわかる。本結果では、2-クロロベンズアルデヒドに対して、0.5 wt% の 2-クロロ安息香酸を添加した条件では酵素反応が約 30 % 阻害され、1.1 wt% 添加した条件では酵素反応が約 50 % 阻害されることがわかった。

## 【 0 0 2 7 】

(実施例 2) アルデヒド化合物のアルカリ処理による反応阻害物質の除去

安息香酸 (反応阻害物質) を 0.2 wt% 含有するベンズアルデヒドを用い、アル

カリ処理による安息香酸の除去を実施した。種々の濃度の水酸化ナトリウム水溶液を調製し、これと上記のベンズアルデヒドを体積比1/1で混合し、静置した後、ベンズアルデヒド相をサンプリングし、HPLCによって安息香酸含量を測定した。

この結果表1に示すように、アルカリ処理によって効率的にベンズアルデヒドに含まれている安息香酸を除去できることがわかった。

【0028】

【表1】

水酸化ナトリウム濃度 (N)	処理後の安息香酸含量 (wt%)	除去率 (%)
0.1N	0.022	91.0
0.01N	0.16	27.9
未処理	0.20	

【0029】

(実施例3) アルデヒド化合物のアルカリ処理による反応阻害物質の除去

実施例2と同様に安息香酸を0.2wt%含有するベンズアルデヒドを用い、水酸化ナトリウム水溶液の濃度を0.1Nに一定とし、ベンズアルデヒドに対するアルカリ水溶液の量を変化させて、安息香酸の除去効果を検討した。

表2のように、体積比1:1でも十分な安息香酸除去効果があることが分かった。

【0030】

【表2】

ベンズアルデヒド:0.1N NaOH (v:v)	処理後の安息香酸含量 (wt%)	除去率 (%)
1:1	0.043	86.0
10:1	0.21	13.7
1:10	0.008	96.9
未処理	0.22	

【0031】

(実施例4) アルカリ処理したアルデヒド化合物を用いた酵素反応

2-クロロベンズアルデヒド及び等量の0.1N NaOH水溶液を用いて、実施例3と

同様のアルカリ処理を繰り返し行って2-クロロ安息香酸濃度を0.03wt%以下にした2-クロロベンズアルデヒド（処理前の2-クロロ安息香酸濃度 1.4wt%）、及び最初から2-クロロ安息香酸濃度の低い未アルカリ処理の2-クロロベンズアルデヒド（2-クロロ安息香酸濃度 0.03wt%以下）のそれぞれを基質として（R）-2-クロロマンデロニトリルの合成反応を行った。

## 【0032】

用いたアルデヒド化合物以外は実施例1と全く同じ条件で酵素反応を行った。反応開始3時間後のアルデヒド転換率を測定したところ、アルカリ処理したアルデヒドを用いた場合、及び安息香酸濃度の低いアルデヒドを用いた場合ともに転換率は69%であり、アルカリ処理を行うことで反応阻害物質が除去され、最初から安息香酸濃度が低い未アルカリ処理のアルデヒドを使った場合と全く同じ反応効率が得られることがわかった。

## 【0033】

## 【発明の効果】

本発明によれば、酵素反応に使うと活性に悪影響を与えるまで変質したアルデヒドであっても、アルカリ処理という、きわめて簡便な処理を行うことによってアルデヒド中の反応阻害物質をほぼ完全に除去することができ、変質していないアルデヒドと同等の原料として酵素反応に用いることができ、目的生成物の収率を大幅に改善できる。

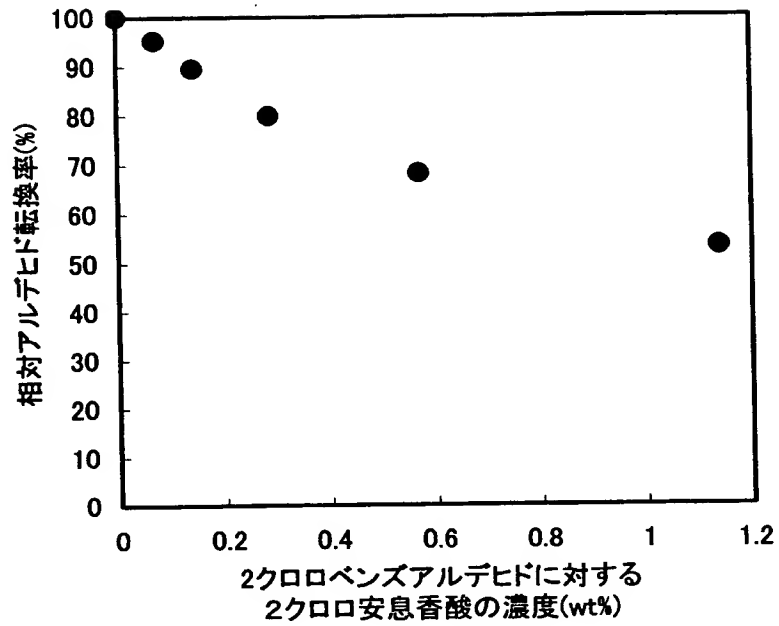
## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

原料の2-クロロベンズアルデヒド中に含まれる2-クロロ安息香酸の濃度と2-クロロベンズアルデヒドの転換率との関係を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アルデヒド化合物を基質とする酵素反応において、酵素反応を阻害する物質を除去し、高収率で目的生成物を得る酵素反応方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 アルデヒド化合物を基質とする酵素反応において、アルカリ処理により基質のアルデヒド化合物中のカルボン酸化合物を除去した後、酵素反応を行うことを特徴とする酵素反応方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004628]

1. 変更年月日 1991年 6月11日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号  
氏 名 株式会社日本触媒
2. 変更年月日 2000年12月 6日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号  
氏 名 株式会社日本触媒